



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

LUÍSA RODRIGUES E RODRIGUES

**VESÍCULAS DE EXOCITOSE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
COMO CARREADORAS DE kDNA**

**BRASÍLIA, DF
2016**

LUÍSA RODRIGUES E RODRIGUES

**VESÍCULAS DE EXOCITOSE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
COMO CARREADORAS DE kDNA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico
Generalista, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Machado Hecht

BRASÍLIA, DF

2016

Rodrigues, Luísa R.

RL953v

Vesículas de exocitose de *Trypanosoma cruzi* como carreadoras de kDNA / Luísa Rodrigues e Rodrigues. orientador: Izabel Cristina Rodrigues da Silva; co-orientador: Mariana Machado Hecht. -- Brasília, UnB, 2016, 44p.

Monografia (Graduação – Farmácia) -- Universidade de Brasília/ Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2016.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Vesículas. 4. PCR. 5. kDNA.

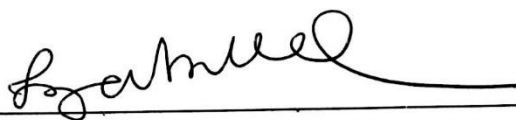
LUÍSA RODRIGUES E RODRIGUES

**VESÍCULAS DE EXOCITOSE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
COMO CARREADORAS DE kDNA**

BANCA EXAMINADORA

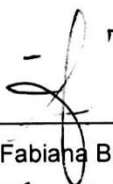


Profa. Dra. Calliandra Maria de Souza Silva
(IB/ Universidade de Brasília)



Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
Professora Adjunta - FCE | UnB
Matr. 1064046



Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe pelo seu amor incondicional e apoio em todas as minhas decisões. À minha amada irmã, por me ajudar e permanecer ao meu lado sempre. Aos meus amigos pelas risadas diárias e companheirismo e aos professores, responsáveis pela construção do meu conhecimento.

Em especial, agradeço à professora Izabel por ter aceitado o meu convite e por todo suporte e atenção que me foi dado durante essa etapa final. Não poderia ter escolhido alguém melhor! Também agradeço à Mari, que me orientou durante 3 anos e foi importantíssima para a minha formação acadêmica e essencial para o desenvolvimento desse trabalho. À Aline, por todo apoio e amparo durante esse processo, e à todas as pessoas que conviveram comigo durante esses 3 anos no Laboratório Interdisciplinar de Biociências, em especial Bruna e Búzios, meu mais sincero obrigada!

RESUMO

A patogênese da doença de Chagas está relacionada a reações autoimunes que podem ser desencadeadas pela transferência de kDNA do *Trypanosoma cruzi* para o genoma hospedeiro. As vesículas de exocitose são importantes na transferência de informações entre células que não possuem contato direto e, sabendo disso, foram isoladas por meio de placas *Transwell* para avaliar se aumentam a infectividade do *T. cruzi* e se transportam minicírculos de kDNA. Outro objetivo foi verificar se o tratamento das culturas com zidovudina, colchicina ou benzonidazol previne a liberação das vesículas e, conseqüentemente, a integração do kDNA. Para isso, as vesículas foram cultivadas com macrófagos da linhagem J774.A1. Macrófagos com ou sem contato prévio com as vesículas foram infectados com 10^6 parasitos e a taxa de infectividade das culturas foi determinada por qPCR. A incubação prévia da cultura com as vesículas promoveu aumento da infectividade das mesmas. Foram realizadas PCRs de nDNA e kDNA para eliminar a passagem do *T. cruzi* pela *Transwell* e para determinar a presença dos minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no interior das vesículas, respectivamente. Foram visualizadas bandas de kDNA em todos os poços que continham vesículas de *T. cruzi*. Por outro lado, a análise por PCR demonstrou ausência de bandas específicas de kDNA do parasito com o uso das drogas. Como atualmente o tratamento é insatisfatório, a compreensão do papel das vesículas secretadas pelo *T. cruzi* na patogênese da doença de Chagas é de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, vesículas, PCR, kDNA.

ABSTRACT

The pathogenesis of Chagas disease is related to autoimmune reactions, which can be triggered by the kDNA transfer of *Trypanosoma cruzi* into the host genome. The exocytosis vesicles are important in the transfer of information between cells that do not have direct contact. Knowing that the vesicles were isolated by *Transwell* plates to evaluate if the infectivity of *T. cruzi* increases, and if they are carrying mini-circles of kDNA. Another objective was check if the treatment of the cultures with zidovudine, colchicine or benznidazole prevents the release of the vesicles and the kDNA integration process. For this, the vesicles were cultured with macrophages J774.A1 lineage. Macrophages with or without previous contact with the vesicles were infected with 10^6 parasites and infectivity rate of the cultures was determined by qPCR. Preincubation of culture with the vesicles promoted increased infectivity. PCRs of nDNA and kDNA were performed to eliminate the passage of *T. cruzi* by *Transwell* and to determine the presence of minicircles of kDNA of *T. cruzi* inside the vesicles, respectively. kDNA bands were visualized in all wells containing *T. cruzi* vesicles and the PCR analysis showed the absence of specific bands of kDNA of parasite with the use of drugs. Knowing that treatment is not very effective, and understanding the role of vesicles secreted by *T. cruzi* in the pathogenesis of Chagas disease is of great importance for the development of new therapeutics strategies.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, vesicles, PCR, kDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global da doença de Chagas no período de 2006-2010.....	2
Figura 2 – Manifestações clínicas da doença de Chagas.....	3
Figura 3 – Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 4 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 5 – Liberação de vesículas pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> e infecção de células hospedeiras.....	8
Figura 6 – Curva padrão a partir de diferentes concentrações de nDNA.....	16
Figura 7 – Fluxograma dos procedimentos empregados para realização deste trabalho.....	17
Figura 8 – Incorporação de vesículas secretadas pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> pela célula hospedeira.....	18
Figura 9 – Presença de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em vesículas de exocitose.....	19
Figura 10 – Avaliação da infectividade do <i>Trypanosoma cruzi</i> em células pré-incubadas ou não com as vesículas.....	20
Figura 11 – Tratamento das culturas com zidovudina, colchicina e benzonidazol inibe a integração do kDNA.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para amplificação do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	15
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipo de Cultura)
AZT	Zidovudina
CN	Controle negativo
CP	Controle Positivo
Cq	<i>Quantification Cycle</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Deoxynucleotide <i>triphosphates</i> (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
nDNA	DNA nuclear
ng	Nanograma
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em cadeia)
pH	Potencial Hidrogeniônico
qPCR	PCR quantitativa
SFB	Soro Fetal Bovino
TAE	Tris-Acetato-EDTA

T. cruzi *Trypanosoma cruzi*

°C Graus Celsius

µL Microlitro

µm Micrômetro

µM Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.2 Manifestações Clínicas	2
1.1.3 Tratamento	3
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	4
1.2.1 Ciclo de vida.....	5
1.2.2 Vesículas de exocitose	6
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo Geral	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
4. METODOLOGIA.....	11
4.1 Culturas de células e <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
4.2 Coloração dos parasitos com PKH26	11
4.3 Isolamento das vesículas e infecção das células J774.A1	12
4.4 Incubação da cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i> com inibidores.....	13
4.5 Extração e quantificação de DNA das células e vesículas	13
4.6 Reações de polimerização em cadeia (PCRs).....	13
4.6.1 PCR convencional e análise eletroforética	13
4.6.2 PCR quantitativa	15
4.6.2.1 Análise estatística	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Incorporação das vesículas pelos macrófagos J774.A1	18
5.2 Presença de kDNA nas vesículas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19

5.3 Aumento da infectividade do <i>Trypanosoma cruzi</i> em culturas de macrófagos.....	20
5.4 Inibição da integração do kDNA com tratamento das células J774.A1	21
6. CONCLUSÃO.....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909, que nomeou o parasito em homenagem ao seu mentor Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909). É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e atualmente encontrada em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, atingindo cerca de oito milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2016a).

1.1.1 Epidemiologia

Estima-se que oito milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 mortes por ano. No entanto, devido a mobilidade das pessoas entre América Latina e o resto do mundo durante as últimas décadas, ocorreu aumento de casos nos Estados Unidos da América, Canadá, Europa e alguns países do Pacífico Ocidental (WHO, 2016b) (Figura 1).

A principal transmissão aos seres humanos é pelo contato com fezes contaminadas de triatomíneos hematófagos, popularmente conhecidos como barbeiros (WHO, 2016a), mas também pode ser congênita e adquirida por procedimentos de transfusão com sangue contaminado, transplante de órgãos contaminados, acidente de laboratório e por alimentos ou bebidas contaminadas (CDC, 2013).

No Brasil, é predominante os casos crônicos da doença de Chagas. Porém, nos últimos anos, tem sido observada a ocorrência da fase aguda da doença nos estados da Amazônia Legal e alguns casos isolados em outros estados. No período de 2000 a 2011, foram registrados mais de 1.200 casos no Brasil, sendo 70% por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial e 22% sem identificação do modo de transmissão (FIOCRUZ, 2013).

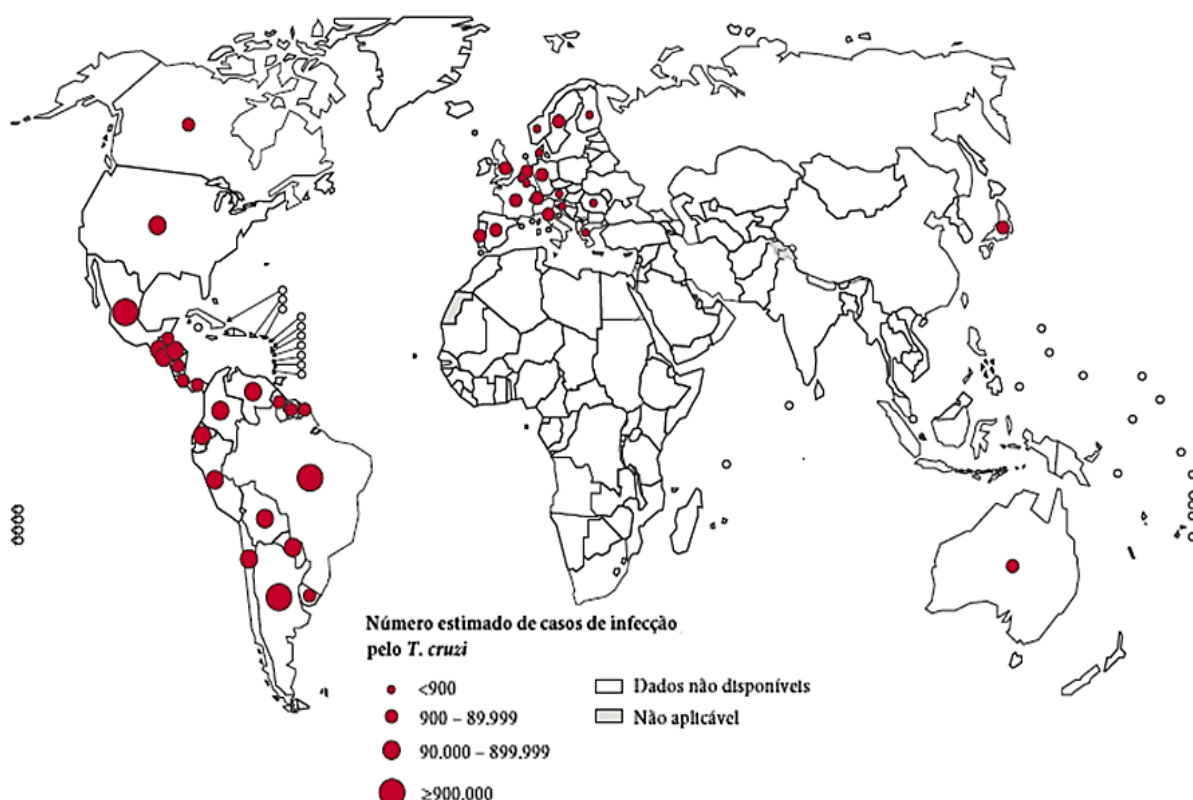


Figura 1: Distribuição global da doença de Chagas no período de 2006-2010 (Adaptado de WHO, 2013).

1.1.2 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da doença de Chagas acometem o coração, intestinos e sistema nervoso periférico (TEIXEIRA *et al.*, 2011a) e se diferenciam na fase aguda e crônica.

Os casos agudos são caracterizados pela presença do *T. cruzi* no sangue do paciente e geralmente são assintomáticos. Quando sintomáticos pode haver febre, mal-estar, dores musculares e articulares, sonolência, cólicas e diarreia, edema, distúrbios respiratórios e cianose (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Em alguns pacientes ocorre a inflamação e o inchaço no local da inoculação, conhecido como chagoma, que ocorre tipicamente na face ou extremidades. A inoculação através da conjuntiva leva ao edema unilateral característico das pálpebras superior e inferior, conhecido como o sinal Romanã (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Essa fase normalmente entra em remissão espontânea e a infecção entra na fase crônica dentro de 3 a 4 meses após o seu aparecimento (TEIXEIRA *et al.*, 2006) (Figura 2A).

Na fase crônica da doença de Chagas aproximadamente 30% das pessoas infectadas desenvolvem complicações cardíacas e miocardiopatia chagásica caracterizadas por arritmias ventriculares, aneurismas, diminuição da fração de ejeção e morte súbita cardíaca (RASSI; LITTLE, 2000). As manifestações clínicas se desenvolvem ao longo de 10 a 30 anos e são clinicamente aparentes em fases posteriores da doença (BERN *et al.*, 2011). O diagnóstico e tratamento precoce é importante para a prevenção de insuficiência irreversível da função cardíaca (GARCIA *et al.*, 2015) (Figura 2B).

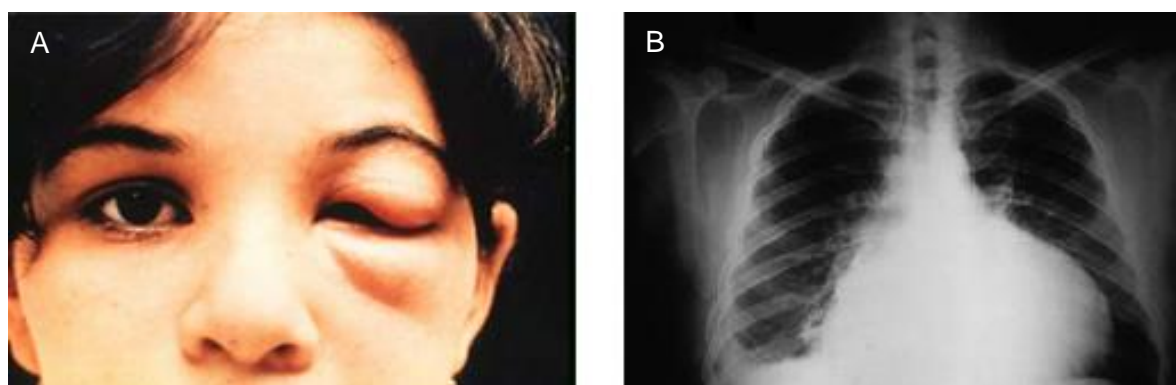


Figura 2: Manifestações clínicas da doença de Chagas. (A) Sinal de Romanã e (B) cardiomiopatia dilatada (Retirado de CDC, 2013; WHO, 2016).

1.1.3 Tratamento

O tratamento da doença de Chagas é alvo de muitas investigações, possivelmente porque a cura desta doença é um objetivo de alta relevância social (PIRES, 2007), tendo em vista que o tratamento é insatisfatório, não havendo remédios ou vacinas capazes de prevenir o desenvolvimento da patologia (BILATE E CUNHA-NETO, 2008).

Atualmente, a doença de Chagas pode ser tratada com benzonidazol e nifurtimox (WHO, 2015). As duas drogas agem por formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos (MAYA *et al.*, 2003). No entanto, apenas o benzonidazol está disponível no Brasil (FIOCRUZ, 2013), tendo em vista que o nifurtimox é altamente tóxico e, por isso, não tem autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para ser comercializado. Ambos são eficazes quando utilizados durante a fase aguda da doença, porém possuem eficácia reduzida quando administrados na

fase crônica, não evitando as manifestações clínicas da doença de Chagas (BONNEY, 2014; MORILLO *et al.*, 2015; WHO, 2016a). Sendo assim, a compreensão do papel das vesículas secretadas pelo *T. cruzi* na patogênese da doença de Chagas é de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, tendo em vista que o único tratamento existente no Brasil é insatisfatório.

O benzonidazol é fornecido pelo Ministério da Saúde, gratuitamente, e deve ser utilizado durante 60 dias em pessoas com a doença de Chagas na fase aguda. Para os portadores da doença crônica, deve ser avaliado cada caso, mas a indicação desse medicamento é para aqueles que não apresentam sintomas (BRASIL, 2014).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* (RASSI *et al.*, 2010). Apresenta flagelo e mitocôndria tubular única, onde se encontra o cinetoplasto, que possui uma rede de DNA conhecido como kDNA (MORAES, 2016) (Figura 3).

Possui um ciclo complexo com três principais formas evolutivas. Nos mamíferos são encontradas a forma infectiva chamada tripomastigota e a forma multiplicativa chamada de amastigota intracelular. No triatomíneo é encontrada a forma multiplicativa epimastigota e a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

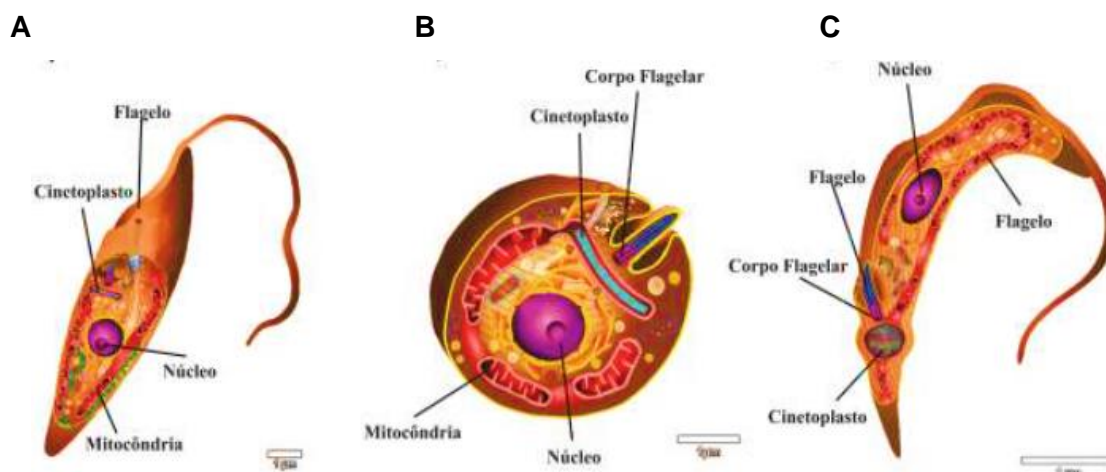


Figura 3: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Forma epimastigota, multiplicativa no intestino médio do inseto. (B) Forma amastigota, replicativa no hospedeiro vertebrado e (C) forma tripomastigota (Retirado de MORAES, 2016).

1.2.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia quando triatomíneos ingerem formas tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro mamífero infectado. Uma vez no inseto vetor, tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas que, depois de várias multiplicações por divisão binária, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas. Essas formas são depositadas com as fezes do vetor durante o repasto sanguíneo. A transmissão para um novo hospedeiro mamífero ocorre quando as fezes contaminadas se depositam nas membranas das mucosas nasais ou orais, na conjuntiva ou feridas na pele. Uma vez no hospedeiro mamífero, tripomastigotas entram nas células hospedeiras e diferenciam-se em formas amastigotas. Amastigotas se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas, que são liberadas na corrente sanguínea por meio de rupturas das células hospedeiras (MACHADO *et al.*, 2012) (Figura 4).

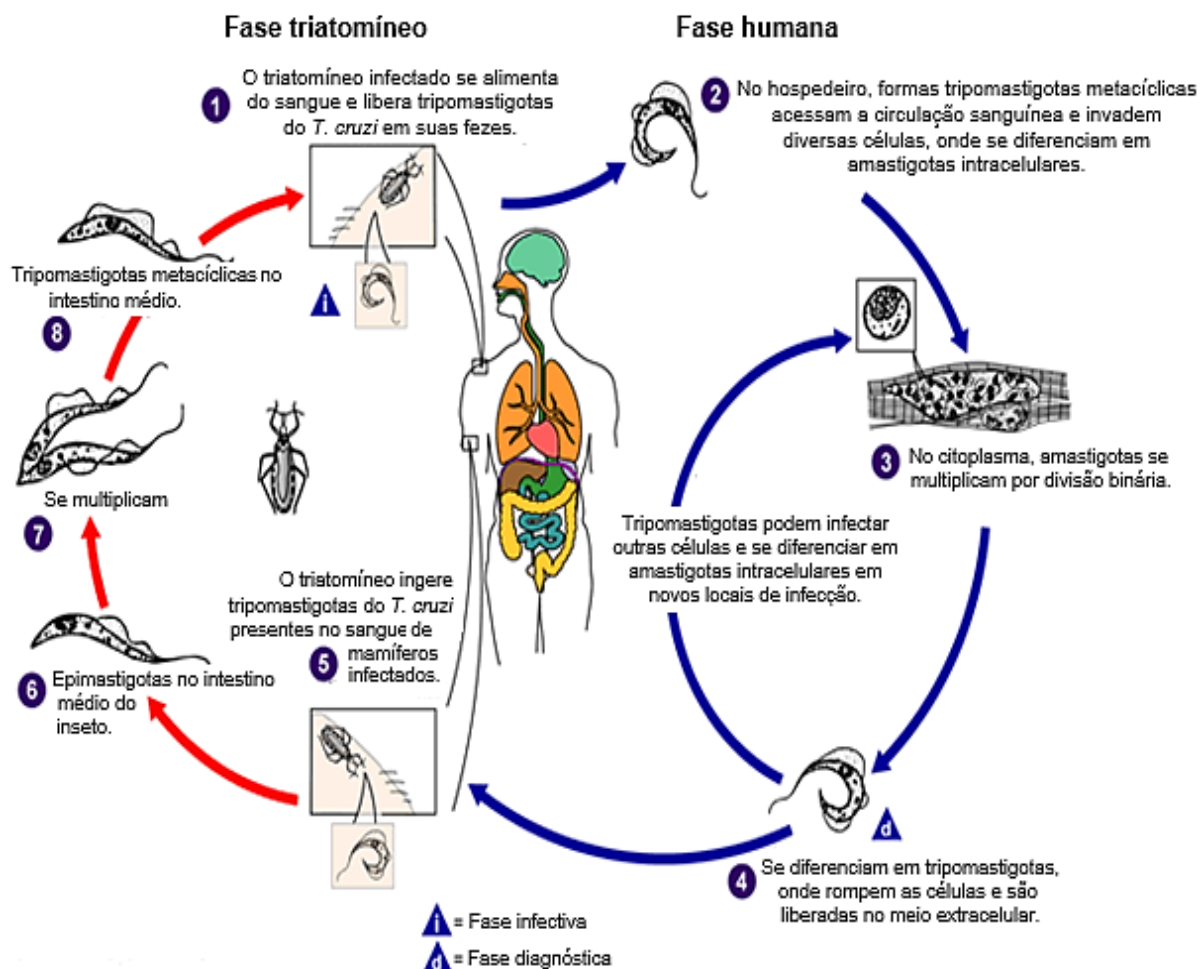


Figura 4: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) O triatomíneo infectado se alimenta do sangue e libera formas tripomastigotas de *T. cruzi* em suas fezes, perto do local do repasto sanguíneo. (2) Dentro do hospedeiro, formas tripomastigotas metacíclicas acessam a circulação sanguínea e invadem diversos tipos celulares, por exemplo, macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. (3) No citoplasma, amastigotas se multiplicam por divisão binária (4) e se diferenciam em tripomastigotas, onde rompem as células e são liberadas no meio extracelular. (5) Formas tripomastigotas infectam novas células e se transformam em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. O triatomíneo ingere formas tripomastigotas do *T. cruzi* presentes no sangue periférico de mamíferos infectados. (6) Formas tripomastigotas ingeridas se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do inseto. (7) Epimastigotas se multiplicam (8) e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino médio (Adaptado de CDC, 2015).

1.2.2 Vesículas de exocitose

As vesículas de exocitose são menores do que $1\mu\text{m}$ e importantes na transferência de informações entre células que não possuem contato direto. Existem evidências de que elas estão envolvidas na regulação de muitos processos fisiológicos, tais como o controle imunológico e a reparação dos tecidos. No entanto,

elas também estão ligadas à formação e progressão do tumor, bem como à patologia e propagação de doenças virais (BOOTH *et al.*, 2006).

Estudos mostraram a liberação de vesículas em doenças parasitárias, atuando tanto na intercomunicação parasito-parasito, bem como nas interações parasito-hospedeiro (SCHOREY; BHATNAGAR, 2008; TWU; JOHNSON, 2014). Foi visto que os tripanossomatídeos são capazes de produzir e liberar diferentes tipos de vesículas que desempenham papéis importantes na interação parasito-hospedeiro, permitindo a sobrevivência de agentes patogênicos e replicação dentro do hospedeiro (GEIGER *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 1991). Formas tripomastigotas de *T. cruzi* liberam continuamente vesículas que são enriquecidas com proteínas trans-sialidase (TS) /gp85 e superfamílias de mucinas (SOARES *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2000). Muitas destas proteínas estão envolvidas nos processos de adesão celular e invasão (MAGDESIAN *et al.*, 2001; MAGDESIAN *et al.*, 2007).

Em 1979, foi demonstrada pela primeira vez a secreção de microvesículas de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi visto que elas são ricas em glicoconjugados e derivam principalmente da membrana plasmática e bolso flagelar (SILVEIRA; ABRAHAMSOHN; COLLI, 1979). Posteriormente, foi verificado que elas exibem uma matriz complexa de moléculas e podem ser reconhecidas como invasoras pelas células do sistema imune inato (MARCILLA *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2015). Devido a estas propriedades, pode-se dizer que as vesículas estão envolvidas no controle de processos importantes para a homeostase geral das células e o estabelecimento de patologias.

Após sua liberação, as microvesículas circulam no meio extracelular adjacente ao local de secreção. Em alguns casos, fornecem sinais transmembranares devido à ativação de receptores de superfície (BIANCO *et al.*, 2005). Elas também funcionam na sinalização e na transferência horizontal das suas moléculas de membrana, que são enriquecidas com proteínas e mRNAs específicos. Por esta transferência, as microvesículas podem ser importantes para o metabolismo das células alvo (DEREGIBUS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2005) (Figura 5).

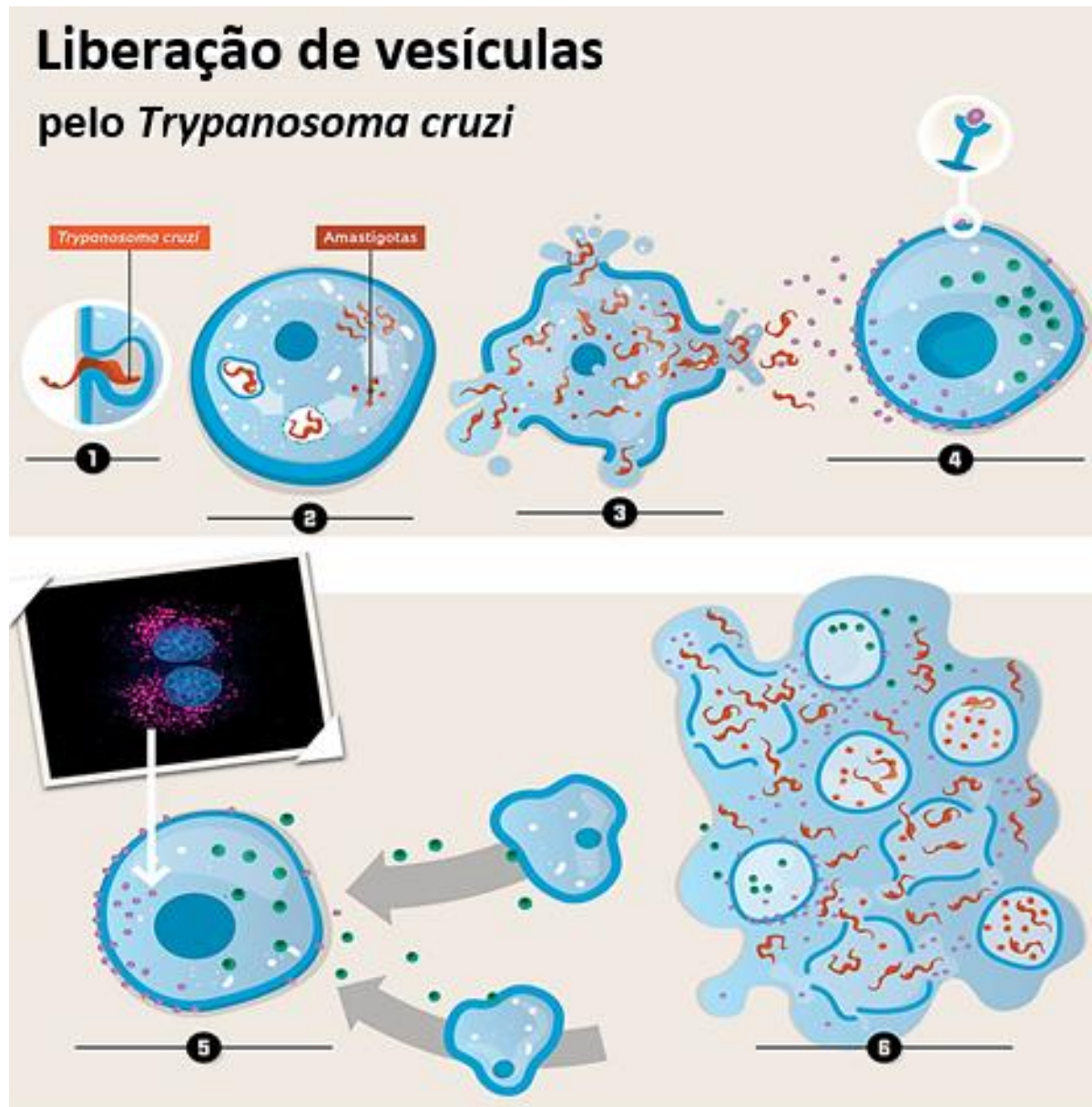


Figura 5: Liberação de vesículas pelo *Trypanosoma cruzi* e infecção de células hospedeiras. (1) O protozoário invade outras células (2) se diferencia, se multiplica, (3) rompe as células e libera vesículas. (4) As vesículas se fundem com a membrana de macrófagos, e outras células de defesa, facilitam a invasão dos parasitos e induzem a produção de citocinas. (5) As citocinas ativam outras células de defesa que podem eliminar os parasitos. (6) Chegam mais parasitos, que liberam mais vesículas e, por mecanismos ainda incertos, alteram as respostas do organismo em benefício deles. (Adaptado de FIORAVANTI, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A percepção atual sobre as vesículas de exocitose mudou drasticamente devido ao seu novo papel como mediadoras na transmissão de sinais biológicos e respostas imunes (THERY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Estudos mostraram que as formas tripomastigotas de *T. cruzi* liberam vesículas que são enriquecidas com proteínas (SOARES *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2000) envolvidas nos processos de adesão celular e invasão (MAGDESIAN *et al.*, 2001; MAGDESIAN *et al.*, 2007).

Sabendo da importância das vesículas de exocitose na patogênese da doença de Chagas, na qual possui tratamento insatisfatório, a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas imunológicas à infecção por parasitos é importante para prevenir e controlar os eventos imunopatológicos durante a doença. Sendo assim, a identificação de vesículas de exocitose em *T. cruzi* é importante como uma nova estratégia terapêutica de bloqueio da transmissão do parasito.

Assim, este estudo pode motivar a ampliação de linhas de pesquisa acerca do *T. cruzi* e, conseqüentemente, esclarecer os mecanismos que envolvem a doença de Chagas. Também pode estimular o desenvolvimento de novos tratamentos contra o parasito para a melhoria da qualidade de vida de indivíduos chagásicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se as vesículas de exocitose de *Trypanosoma cruzi* aumentam a infectividade do parasito e se transportam minicírculos de kDNA.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar as microvesículas de *T. cruzi*;
- Determinar a presença de kDNA nessas microvesículas;
- Verificar se o tratamento com zidovudina, colchicina ou benzonidazol previne a liberação das vesículas e integração do kDNA;
- Avaliar se há aumento da infectividade das culturas de macrófagos incubadas previamente com as microvesículas.

4. METODOLOGIA

4.1 Culturas de células e *Trypanosoma cruzi*

Foram cultivados macrófagos da linhagem J774.A1 (ATCC TIB-67) em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), em garrafas para cultura de 75cm², mantida em atmosfera de CO₂ a 5%, com trocas de meio realizadas a cada 48 horas. A partir da formação de uma monocamada das células, foi realizada a raspagem total das mesmas, com auxílio de uma haste de plástico, para sua transferência para as placas *Transwell*.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da linhagem Berenice, foram cultivadas em células musculares murinas da linhagem L6, em meio DMEM, pH 7,4, acrescido de SFB a 5%, em garrafas para cultura de 75cm² mantida a 37°C em estufa de atmosfera de CO₂ a 5%. Já as formas epimastigotas de *T. cruzi*, da linhagem Berenice, foram cultivadas em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) a 5%, em cilindros de vidro para cultura de 250mL, mantida sob temperatura aproximada de 25°C. A contagem de parasitos no sobrenadante foi realizada por meio da câmara de Neubauer, no microscópio óptico.

4.2 Coloração dos parasitos com PKH26

A incorporação das vesículas pela célula hospedeira foi demonstrada pela microscopia de fluorescência (Olympus BX51, Tokyo, Japan), após coloração dos parasitos com PKH26 (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling), de acordo com instruções do fabricante (Sigma-Aldrich).

Brevemente, 2x10⁷ parasitos foram suspensos em tubo tipo falcon de 15 mL e lavados com meio sem soro. Essa suspensão foi centrifugada (Centrifuge 5804 R, Germany) a 400 g por 10 minutos e o sobrenadante foi aspirado com cuidado para não perturbar o *pellet*, adicionando-se 1 mL do diluente C. Posteriormente, acrescentou-se 4µL de PKH26 em 1 mL do diluente C e esta solução à suspensão de

parasitos, com incubação de 5 minutos. Para finalizar, os parasitos foram centrifugados a 400 g por 10 minutos e o sobrenadante foi removido. O *pellet* foi lavado três vezes em 5 mL de meio completo a 400 g por 5 minutos a 25°C e ressuspensionado em 5 mL do mesmo meio para comprovação da fluorescência dos parasitos em microscópio de fluorescência. Após coloração, foi realizada a adição dos parasitos nas células J774.A1.

A viabilidade do PKH26 foi testada nos parasitos antes da infecção dos macrófagos. Foi visto no microscópio que a fluorescência permaneceu nítida e sem perda da intensidade da cor durante uma semana, que foi o período de análise da viabilidade.

4.3 Isolamento das vesículas e infecção das células J774.A1

As placas *Transwell* (Transwell® 3460, NY, USA) possuem dois compartimentos, o inferior e o superior. Os parasitos foram depositados no compartimento superior, que possui microporos com diâmetros de 0,4µm, possibilitando o isolamento das vesículas. Os macrófagos foram transferidos para o compartimento inferior das placas *Transwell*, na qual foram utilizados, para cada poço, $2,5 \times 10^5$ células J744.A1 em 2 mL de meio DMEM 5%. Após o plaqueamento, esperou-se 24 horas para as células aderirem à parede da placa e serem submetidas à infecção.

Macrófagos sem ou com contato prévio com vesículas de tripomastigotas e epimastigotas por 72h foram infectados com formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* Berenice. Para cada poço da placa *Transwell* foi estabelecido a quantidade 10^6 epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* que foram inoculados no compartimento superior da placa, em 500µL de meio DMEM 5%. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e a taxa de infectividade das culturas foi determinada por PCR em tempo real (qPCR).

4.4 Incubação da cultura de *Trypanosoma cruzi* com inibidores

Após 24 de exposição às microvesículas, foi realizado o tratamento com inibidores para avaliar a integração do kDNA. As formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com benzonidazol (droga tripanocida), colchicina (inibidor de exocitose) ou zidovudina (inibidor da transcriptase reversa). Utilizou-se 50µM de colchicina (ROSA, 2005), 36,7µM de zidovudina (ROSA, 2005) e 161,28µM de benzonidazol (MORAES, 2016).

Após serem feitas as diluições necessárias, os inibidores foram depositados no compartimento superior da placa *Transwell*, junto com os parasitos, que teve seu volume completado para 800µL com meio DMEM 10%. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

4.5 Extração e quantificação de DNA das células e vesículas

Para a extração de DNA, coletou-se o conteúdo dos compartimentos inferiores das placas *Transwell* (células J774.A1 ou meio com vesículas), submetendo-os à extração de DNA com o kit Biopur Mini Spin Plus 250 (Lote: R20150903), de acordo com as instruções do fabricante. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Após extração, as amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoVue Plus® e diluídas para a concentração de 100ng.

4.6 Reações de polimerização em cadeia (PCRs)

4.6.1 PCR convencional e análise eletroforética

Inicialmente, a qualidade do DNA extraído foi testada pela PCR utilizando *primers* para o gene da β -actina. Os produtos amplificados foram visualizados pela

eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio 0,5 mg/mL, em tampão TAE 1X (Tris acetato 90 mM pH 8,0; EDTA 25 mM).

A presença de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no interior das vesículas foi determinada por PCR, no termociclador MyCycler™ (USA) com os *primers* S35 e S36, específicos das regiões constantes de minicírculos de kDNA (STURM *et al.*, 1989), resultando em banda de 330 pares de base (pb) e seus catâmeros (Tabela 1). Utilizou-se 200ng de DNA das amostras e controles, além de um branco (sem DNA). A PCR seguiu as seguintes condições: tampão de reação 10 X para PCR da Invitrogen (20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂; 0,5µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação seguiu a seguinte padronização: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; uma extensão final a 72°C de 5 minutos e 4°C por tempo ∞. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,3%, corado com brometo de etídeo.

A amplificação do DNA nuclear (nDNA) do *T. cruzi*, para excluir a passagem do parasito pela placa *Transwell*, foi realizada com os *primers* TCZ 3 e TCZ 4, que geram um produto de aproximadamente 168 pb (NDAO *et al.*, 2000) (Tabela 1), no termociclador MyCycler™, USA. Utilizou-se 200ng de DNA das amostras e controles, além de um branco (sem DNA). A PCR seguiu as seguintes condições: tampão de reação 10 X para PCR da Invitrogen (20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂; 0,5µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação seguiu a seguinte padronização: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de: desnaturação a 95°C por 40 segundos, anelamento a 68°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos; uma extensão final a 72°C de 7 minutos e 4°C por tempo ∞. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo.

Tabela 1: Primers utilizados para amplificação do DNA de *Trypanosoma cruzi*

Primers	Sequência (5'→ 3')	Produto Estimado	Amplificação
S35	ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC	330 pb	kDNA
S36	GGT TCG ATT GGG GTT GGT G		
TCZ3	TGC ACT CGG CTG ATC GTT T	168 pb	nDNA
TCZ4	ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA		

(STURM *et al.*, 1989; NDAO *et al.*, 2000).

4.6.2 PCR quantitativa

Foi realizada qPCR para determinação da taxa de infecção das culturas que tiveram ou não incubação prévia com as vesículas. A qPCR do nDNA foi feita com os iniciadores TCZ 3 e TCZ 4 (NDAO *et al.*, 2000). Como molde para a qPCR, foi usado 100ng de DNA, 0,2 µM de cada iniciador, 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20µL. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em triplicata, no termociclador 7500 *Real-time PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 50°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de: anelamento a 95°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C de 10 segundos.

A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas de DNA do parasito de 10^5 a 10^{-1} parasitos/mL. Ela apresentou eficiência de 96.6 %, $R^2 = 0.959$ e slope de -3.4 (Figura 6). Essa curva foi salva e utilizada para a quantificação da reação de qPCR por meio da equação da reta formada ($y = a+b$, onde y é o Cq da amostra; x é a quantidade do produto amplificado a ser calculada; a é o coeficiente angular da reta e b é o coeficiente linear).

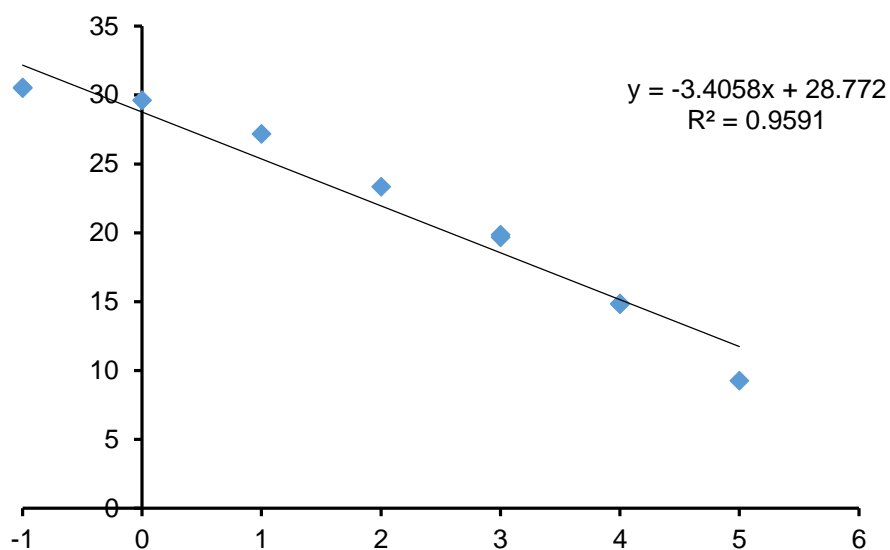


Figura 6: Curva padrão a partir de diferentes concentrações de nDNA. Eficiência de 96.6 %, $R^2 = 0.959$ e slope de -3.4 (Fonte: Própria autora, 2016).

4.6.2.1 Análise estatística

Para executar a avaliação da infectividade do *Trypanosoma cruzi* em células pré-incubadas ou não com as vesículas, foi efetuada uma ANOVA one way Split-plot com post teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. O programa estatístico utilizado foi o Graph Prism versão 5.0.

Todos os experimentos realizados neste trabalho estão resumidos no fluxograma abaixo (Figura 7).

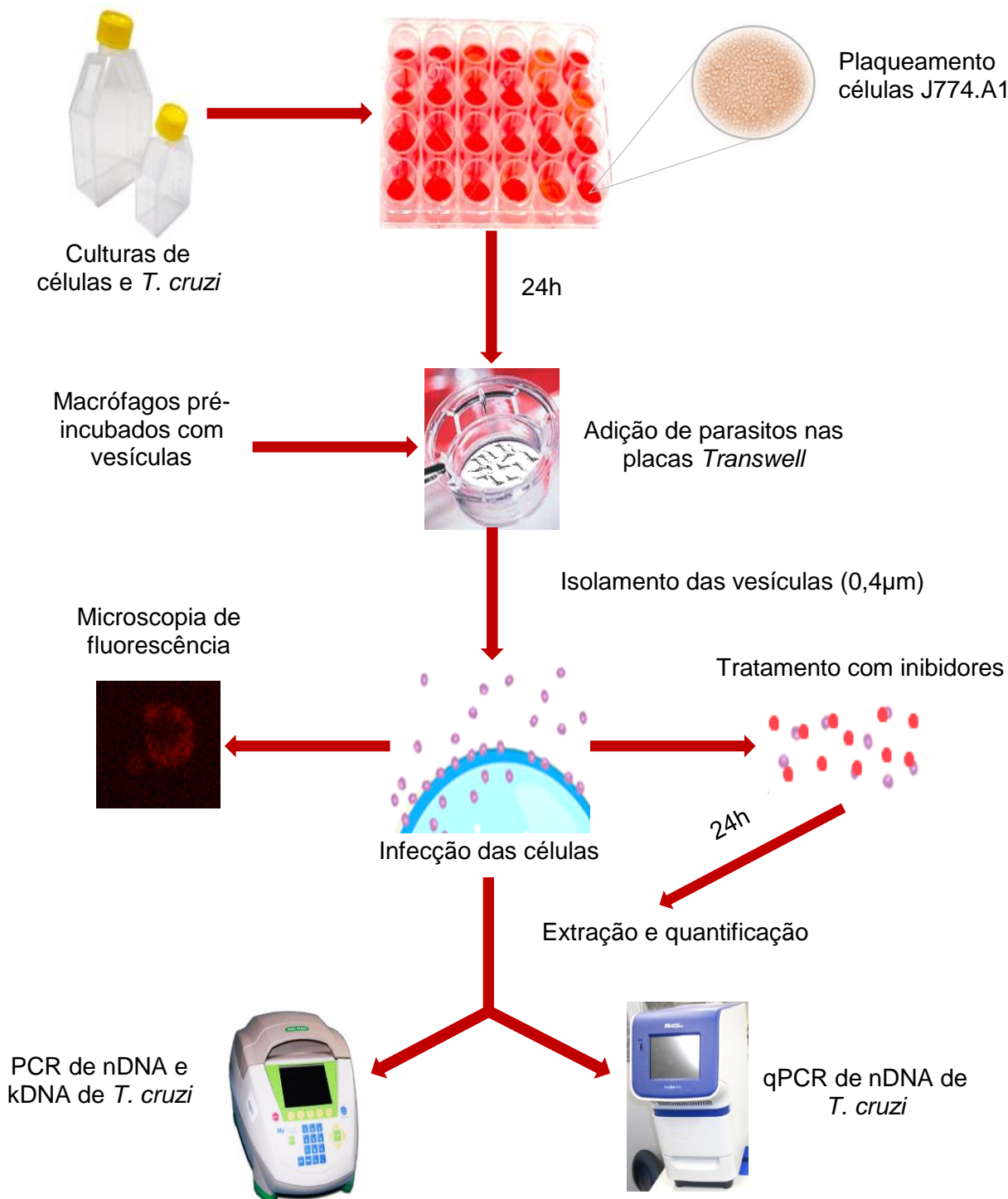


Figura 7: Fluxograma dos procedimentos empregados para realização deste trabalho. Isolamento das vesículas de formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, infecção de macrófagos, tratamento com inibidores e realização de PCRs (Fonte: Própria autora, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Incorporação das vesículas pelos macrófagos J774.A1

Para demonstrar a transferência de vesículas secretadas pelo *T. cruzi* via sistema *Transwell*, observamos em microscópio de fluorescência os macrófagos J774.A1, que foram incubados com os parasitos marcados com PKH26 durante 72 horas, período correspondente à infecção. O corante PKH26 não altera o crescimento e divisão celular e, ao se ligar em fosfolípidios presentes na membrana, emite fluorescência vermelha (MUKHERJEE *et al.*, 2015).

Assim, como demonstrado na Figura 8, houve incorporação das vesículas pela célula hospedeira (Figura 8B), confirmada por meio da microscopia de fluorescência (Figura 8C), que mostrou as vesículas no interior dos macrófagos coradas em vermelho.

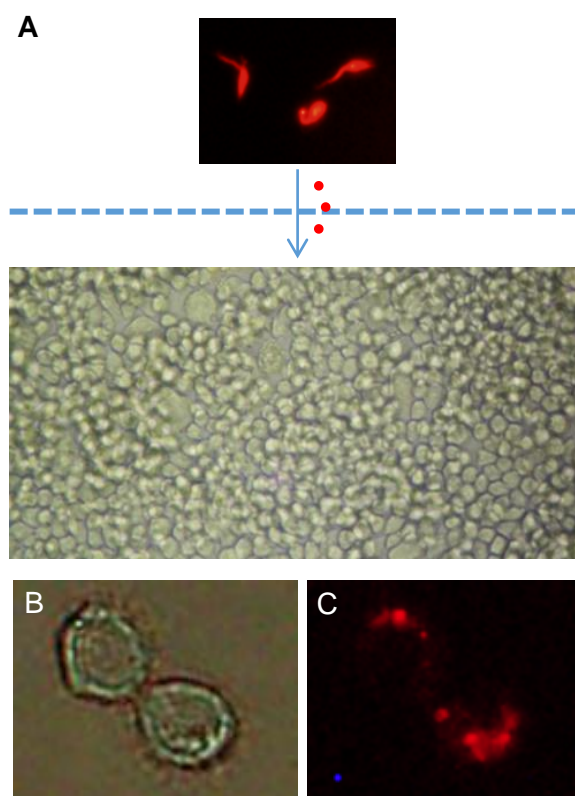


Figura 8: Incorporação de vesículas secretadas pelo *Trypanosoma cruzi* pela célula hospedeira. (A) Esquema representativo da passagem das vesículas liberadas pelo *T. cruzi* pelo sistema *Transwell*. Na parte superior, encontram-se formas epimastigotas coradas com PKH26. Na parte inferior, macrófagos murinos J774.A1. (B) Células J774.A1 observadas em campo claro e em (C) microscopia de fluorescência. Note a coloração dos macrófagos mediada pelas vesículas (Fonte: Própria autora, 2016).

5.2 Presença de kDNA nas vesículas do *Trypanosoma cruzi*

A presença de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* nas vesículas de exocitose de formas tripomastigotas e epimastigotas e sua integração no genoma da célula hospedeira foi demonstrada por PCR seguida de análise eletroforética, onde se observou bandas esperadas de 330 pb (Figura 9A).

A possibilidade do kDNA ter sido amplificado diretamente do parasito foi excluída pela PCR com *primers* para nDNA TCZ 3 e TCZ 4 (Figura 9B), que geram um produto de aproximadamente 168 pb, onde se observou a presença da banda específica apenas no *T. cruzi* e no controle positivo.

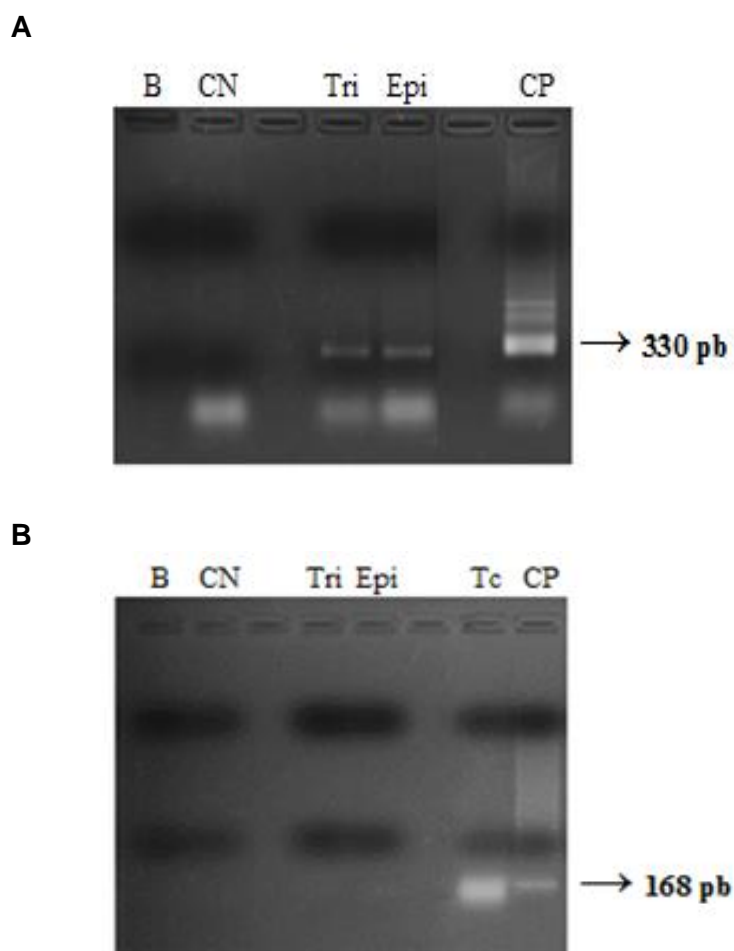


Figura 9: Presença de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em vesículas de exocitose. (A) Amplificação do kDNA de *T. cruzi* com *primers* S35/S36. (B) Amplificação do nDNA de *T. cruzi* com *primers* TCZ3/TCZ4. Os experimentos foram realizados em triplicata. B, branco; CN, controle negativo (macrófago não infectado); Tri, vesículas secretadas pelas formas tripomastigotas; Epi, vesículas secretadas pelas formas epimastigotas; Tc, *T. cruzi*; CP, controle positivo (macrófago infectado) (Fonte: Própria autora, 2016).

Vários estudos demonstraram a transferência gênica horizontal do kDNA de *T. cruzi* para o genoma hospedeiro (TEIXEIRA *et al.*, 1994; HECHT *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2011a; GUIMARO *et al.*, 2014) e sua contribuição na gênese das manifestações clínicas características da doença de Chagas, mesmo na ausência do parasito (TEIXEIRA *et al.*, 2011b). No entanto, o mecanismo exato que desencadeia as reações autoimunes em indivíduos chagásicos ainda não foi elucidado.

Nossos resultados mostram que as vesículas secretadas pelo *T. cruzi* transportam minicírculos de kDNA. Talvez, esse seja um dos fatores responsáveis pelo aumento da infectividade do parasito, uma vez que o kDNA se insere em locais de quebra da dupla-fita do DNA (HECHT *et al.*, 2010), podendo estabilizar o genoma e impedir apoptose celular. No entanto, mais estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

5.3 Aumento da infectividade do *Trypanosoma cruzi* em culturas de macrófagos

A qPCR demonstrou que a incubação prévia da cultura de macrófagos com as vesículas promoveu aumento da infectividade das mesmas, uma vez que a carga parasitária final estava aumentada (Figura 10).

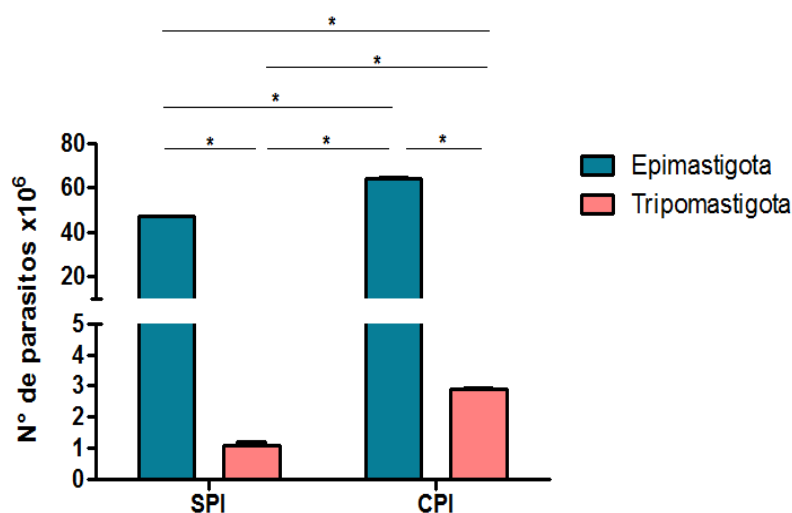


Figura 10: Avaliação da infectividade do *Trypanosoma cruzi* em células pré-incubadas ou não com as vesículas. Média e desvio padrão das quantificações da carga parasitária de macrófagos J774.A1 pré-incubados (CPI) ou não (SPI) com as vesículas secretadas pelas formas tipomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Os experimentos foram realizados em duplicata. *p<0,05 (Fonte: Própria autora, 2016).

Quando não ocorreu pré-incubação dos macrófagos com as vesículas, foram quantificados $1,1 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ tripomastigotas e $4,7 \times 10^7 \pm 0,08 \times 10^7$ epimastigotas. Quando ocorreu a incubação prévia, foram quantificados $2,9 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6$ tripomastigotas e $6,4 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ epimastigotas. Esses dados indicam que a pré-incubação com as vesículas gerou aumento na quantificação parasitária de, aproximadamente, 2,6 vezes para tripomastigotas e 2,2 vezes para epimastigotas.

Portanto, as vesículas de *T. cruzi* aumentam a infectividade do parasito em culturas de macrófagos em mais de duas vezes. Isso corrobora com estudo de Rudzki (RUDZKI *et al.*, 2013), que demonstrou que a liberação de vesículas do *Plasmodium falciparum* promove aumento da transmissão e sobrevivência do parasito em células infectadas. Ademais, Torrecilhas (TORRECILHAS *et al.*, 2009) mostrou que a inoculação de vesículas de exocitose em camundongos BALB/c, antes da infecção pelo *T. cruzi*, resultou no aumento da parasitemia, inflamação intensa e patologia cardíaca grave.

As vesículas liberadas pelas formas tripomastigotas promoveram um aumento de infectividade um pouco maior do que o observado para as formas epimastigotas. Isso pode ser devido ao fato do tripomastigota representar a forma infectante de células de mamíferos, sendo o sucesso da invasão e multiplicação determinante para a sobrevivência do parasito em seu hospedeiro.

Assim, esses resultados mostraram que as vesículas de exocitose parecem preparar o ambiente para entrada dos parasitos, e apontam o seu papel na virulência e patogênese.

5.4 Inibição da integração do kDNA com tratamento das células J774.A1

Sabendo-se que a integração do kDNA é mediada por elementos retrotransponíveis, as células J774.A1 foram tratadas com zidovudina (AZT), evitando que o kDNA transportado nas vesículas do *T. cruzi* se integrasse no genoma hospedeiro. Igualmente, a incubação das células com benzonidazol e colchicina impediu a transferência lateral dos minicírculos de kDNA para o genoma dos

macrófagos, uma vez que não foram visualizadas bandas específicas no gel de agarose (Figura 11).

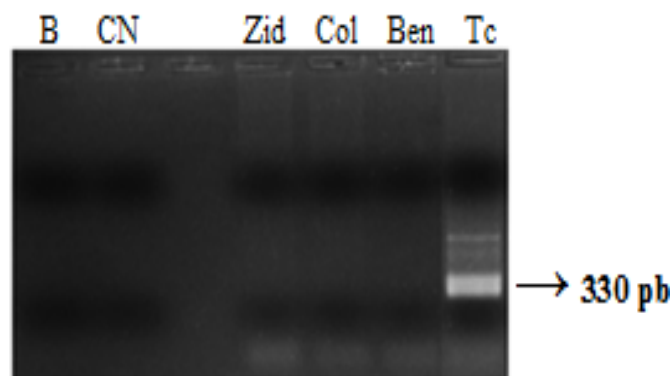


Figura 11: Tratamento das culturas com zidovudina, colchicina e benzonidazol inibe a integração do kDNA. Visualização de kDNA do *Trypanosoma cruzi* em gel de agarose 1,3% após amplificação por PCR com os *primers* S35/S36, que gerou bandas de 330 pb e seus catâmeros. B, branco; CN, controle negativo (macrófago não infectado); Zid, tratamento com zidovudina a 36,7 μ M; Col, tratamento com colchicina a 50 μ M; Ben, tratamento com benzonidazol a 161,28 μ M; Tc, *T. cruzi* (Fonte: Própria autora, 2016).

O AZT, droga inibidora de retrotransposição, impediu a integração de minicírculos de kDNA no genoma das células J774.A1, o que é justificado com estudos anteriores, que demonstraram que o sítio preferencial de integração do kDNA é o retroelemento LINE-1 (HECTH *et al.*, 2010; ROSE, 2013; GUIMARO *et al.*, 2014). Já o resultado do tratamento das culturas com benzonidazol, droga tripanocida, diferiu com estudo recente que demonstrou que essa droga não é capaz de inibir a integração do kDNA no genoma das células J774.A1 (MORAES, 2016). Em relação ao tratamento com colchicina, nosso resultado está de acordo com o esperado, tendo em vista que a colchicina afeta qualquer processo que exige alterações do citoesqueleto celular, incluindo a mitose celular e exocitose (DEFTEREOS *et al.*, 2013).

A compreensão do papel das vesículas secretadas pelo *T. cruzi* na patogênese da doença é de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, uma vez que atualmente, no Brasil, a doença de Chagas só pode ser tratada com benzonidazol, droga considerada pouco eficaz na fase crônica e causadora de diversos efeitos colaterais (MAYA *et al.*, 2003; BILATE; CUNHA-NETO, 2008; MORILLO *et al.*, 2015). Assim, o conhecimento de que drogas inibidoras de exocitose (colchicina) e retrotransposição (zidovudina) podem bloquear a transferência lateral de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma da célula

hospedeira poderá ser utilizado para a elaboração de esquemas de tratamento multidrogas contra o parasito.

6. CONCLUSÃO

Com a realização desse trabalho, por meio do isolamento das microvesículas do *Trypanosoma cruzi*, foi possível constatar, pela primeira vez, que elas transportam minicírculos de kDNA, além de aumentarem a infectividade do parasito em culturas de macrófagos. Também foi verificado que o tratamento dessas culturas com as drogas benzonidazol, colchicina e zidovudina foi capaz de inibir a secreção das vesículas pelo *T. cruzi* e, conseqüentemente, a integração do kDNA no genoma dos macrófagos. No entanto, outros estudos precisam ser realizados para comprovação desses resultados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I. C.; CAMARGO, M. M.; PROCÓPIO, D. O.; SILVA, L. S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; FERGUSON, M. A. J. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J.** 19 (7): 1476-1485, 2000.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P.; *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clin Microbiol Rev.** 24 (4): 655-81, 2011.

BIANCO, F.; PRAVETTONI, E.; COLOMBO, A.; SCHENK, U.; MÖLLER, T.; MATTEOLI, M.; VERDERIO, C. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 β release from microglia. **J Immunol.** 174 (11): 7268-7277, 2005.

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Rev Inst Med Trop.** 50 (2): 67-74, 2008.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? **Parasite.** 21: 11, 2014.

BOOTH, A. M.; FANG, Y.; FALLON, J. K.; YANG, J. M.; HILDRETH, J. E.; GOULD, S. J. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. **J Cell Biol.** 172: 923-935, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tratamento, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-chagas/l2-doenca-de-chagas/11120-tratamento-chagas>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

CAMPOS, J. H.; SOARES, R. P.; RIBEIRO, K.; CRONEMBERGER, A. A.; BATISTA, W. L.; TORRECILHAS, A. C. Extracellular vesicles: role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. **J Immunol Res.** 832057, 2015.

CDC. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Epidemiology & risk factors, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

CDC. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Biology, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 22 out. 2016.

CHAGAS, C. New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schyzotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1: 159-218, 1909.

DEFTEREOS, F.; GIANNOPOULOS, G.; PAPOUTSIDAKIS, N.; PANAGOPOULOU, V.; KOSSYVAKIS, C.; RAISAKIS, K. Colchicine and the heart: pushing the envelope. **J Am Coll Cardiol**. 62 (20):1817-25, 2013.

DEREGIBUS, M. C.; CANTALUPPI, V.; CALOGERO, R.; IACONO, M. L.; TETTA, C.; BIANCONE, L.; BRUNO, S.; BUSSOLATI, B.; CAMUSSI, G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. **Blood**. 110 (7): 2440-2448, 2007.

FIOCRUZ. Doença de Chagas, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

FIORAVANTI, C. Parasita pronto para o ataque: vesículas com proteínas ajudam *Trypanosoma cruzi* a invadir células hospedeiras. [Editorial]. *Pesquisa FAPESP*, ed. 200, p. 70, out., 2012.

GARCIA, M. N.; WOC-COLBURN, L.; AGUILAR, D.; HOTEZ, P. J.; MURRAY, K. O. Historical perspectives on the epidemiology of human Chagas disease in Texas and recommendations for enhanced understanding of clinical Chagas disease in the Southern United States. **PLoS Negl Trop Dis**. 9 (11): e0003981, 2015.

GEIGER, A.; HIRTZ, C.; BECUE, T.; BELLARD, E.; CENTENO, D.; GARGANI, D.; ROSSIGNOL, M.; CUNY, G.; PELTIER, J. B. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. **BMC microbiol**. 10 (1): 20, 2010.

GONÇALVES, M. F.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; DE SOUZA, W.; ALVES, M. J.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp Parasitol.** 72 (1): 43-53, 1991.

GUIMARO, M. C.; ALVES, R. M.; ROSE, E.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; HECHT, M. M.; SOUSA, M. V.; ANDRADE, R. R.; VITAL, T.; PLACHY, J.; NITZ, N.; HEJNAR, J.; GOMES, C.; TEIXEIRA, A. R. L. Inhibition of autoimmune Chagas-like heart disease by bone marrow transplantation. **PLoS Negl Trop Dis.** 8 (12): e3384, 2014.

HECHT, M. M.; NITZ, N.; ARAUJO, P. F.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; GOMES, D. A.; LEONARDECZ, E.; TEIXEIRA, A. R. L. Inheritance of DNA Transferred from American Trypanosomes to Human Hosts. **PLoS One.** 5 (2): e9181, 2010.

LI, Y. C.; LI, Y. N.; CHENG, C. X.; SAKAMOTO, H.; KAWATE, T.; SHIMADA, O.; ATSUMI, S. Subsurface cisterna-lined axonal invaginations and double-walled vesicles at the axonal-myelin sheath interface. **Neuroscience research.** 53 (3): 298-303, 2005.

MACHADO, F. S.; JELICKS, L. A.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIRANI, J.; NAGAJYOTHI, F.; MUKHERJEE, S.; NELSON, R.; COYLE, CM; SPRAY, D. C; CARVALHO, A. C. C; GUAN, F; PRADO, C. M; LISANTI, M.P; WEISS, L.M; MONTGOMERY, S. P; TANOWITZ, H. B. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. **Cardiol Rev.** 20 (2): 53–65, 2012.

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R. I.; COLLI, W.; ALVES, M. J. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **J Biol Chem.** 276 (22): 19382-9, 2001.

MAGDESIAN, M. H.; TONELLI, R. R.; FESSEL, M. R.; SILVEIRA, M. S.; SCHUMACHER, R. I.; LINDEN, R.; COLLI, W.; ALVES, M. J. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Cell Res.** 313 (1): 210-8, 2007.

MARCILLA, A.; MARTIN-JAULAR, L.; TRELIS, M.; MENEZES-NETO, A.; OSUNA, A.; BERNAL, D.; BECERRA, C. F.; ALMEIDA, I. C.; PORTILLO, H. A. D. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **J Extracell Vesicles.** 3: 25040, 2014.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; VERGARA, L. J. N.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochem Pharmacol.** 65 (6): 999-1006, 2003.

MORAES, A. S. *Dinâmica das integrações de minicírculos de kdna de Trypanosoma cruzi no genoma hospedeiro*. 2016. Tese (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI A. JR.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; BONILLA, L.; MEEKS, B.; RAO-MELACINI, P.; POGUE, J.; MATTOS, A.; LAZDINS, J.; RASSI, A.; CONNOLLY, S.J.; YUSUF, S. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med.** 373 (14): 1295-306, 2015.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.** 27: 1477-1482, 1989.

MUKHERJEE, S.; MUKHOPADHYAY, A.; ANDRIANI, G.; MACHADO, F. S.; ASHTON, A. W.; HUANG, H.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. *Trypanosoma cruzi* invasion is associated with trophocytosis. **Microbes Infect.** 17 (1): 62–70, 2015.

NDAO, M.; KELLY, N.; NORMANDIN, D.; MACLEAN, J. D.; WHITEMAN, A.; KOKOSKIN, E.; AREVALO, I.; WARD, B. J. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. **Comp Med.** 50 (6): 658-65, 2000.

PIRES, L. L. Tratamento da Doença de Chagas. In: TEIXEIRA, A. R. L. C. (Org.). *Doenças de Chagas e Evolução*. Brasília: UnB, 2007. v. 1, p. 167-180.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol.** 200 (4): 373-83, 2013.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol.** 23 (12): 883-9, 2000.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet.** 375 (9723), 2010.

ROSA, A. C. *Inibição da transferência de kDNA de Trypanosoma cruzi para a célula hospedeira: aspectos básicos e aplicados da pesquisa.* 2005. Tese de Doutorado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília. 2005.

ROSE, E. C. *Transferência vertical de minicírculos de kDNA de Trypanosoma cruzi no modelo Gallus gallus.* 2013. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília. 2013.

RUDZKI, N. R.; WILSON, D. W.; CARVALHO, T. G.; SISQUELLA, X.; COLEMAN, B. M.; RUG, M.; BURSAC, D.; ANGRISANO, F.; GEE, M.; HILL, A. F. BAUM, J. Cell-cell communication between Malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. **Cell.** 153 (5): 1120-33, 2013.

SCHOREY, J. S.; BHATNAGAR, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. **Traffic.** 9: 871-81, 2008.

SILVEIRA, J. F.; ABRAHAMSOHN, P. A.; COLLI, W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochim Biophys Acta.** 550 (2): 222-232, 1979.

SOARES, R. P.; TORRECILHAS, A. C.; ASSIS, R. R.; ROCHA, M. N.; CASTRO, F. A.; FREITAS, G. F.; MURTA, S. M.; SANTOS, S. L.; MARQUES, A. F.; ALMEIDA, I. C. ROMANHA, A. J. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of alpha-galactosyl residues. **Am J Trop Med Hyg.** 87 (1): 87-96, 2012.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol Biochem Parasitol.** 33 (3): 205-14, 1989.

TEIXEIRA, A. R. L.; ARGAFIARAZ, E. R.; FREITAS JR, L. H.; LACAVA, Z. G. M.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutat Research**. 305 (2): 197-209, 1994.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgrad Med J**. 82 (974): 788-798, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clin Microbiol**. 24 (3): 592-630, 2011a.

TEIXEIRA, A. R. L.; GOMES, C.; NITZ, N.; SOUSA, A.; ALVES, R. M.; GUIMARO, M. C.; CORDEIRO, C.; BERNAL, F. M.; ROSA, A. C.; HEJNAR, J.; LEONARDECZ, C.; HECHT, M. M. *Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. **PLoS Negl Trop Dis**. 5 (3): e1000, 2011b.

THERY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**. 9 (8): 581-93, 2009.

TORRECILHAS, A. C. T.; TONELLI, R. R.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; SCHUMACHER, R. I.; SOUZA, W.; SILVA, N. C.; ABRAHAMSOHN, I. A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes Infect**. 11 (1): 29-39, 2009.

TWU, O.; JOHNSON, P. J. Parasite extracellular vesicles: mediators of intercellular communication. **PLoS Pathog**. 10: e1004289, 2014.

VIRREIRA, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEJA, C.; SOLANO, M.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Trop Med**. 68 (5): 574-582, 2003.

WHO. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006–2010, 2013. Disponível em: http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf. Acesso em: 29 ago. 2016.

WHO. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Fact Sheet Nº 340, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 17 jun. 2016a.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis), 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 29 ago. 2016b.